

Back-titration assay using two different markers

Patent Number: ☐ US5834319
Publication date: 1998-11-10
Inventor(s): EKINS ROGER P (GB)
Applicant(s):
Requested Patent: ☐ WO9518376
Application Number: US19960663172 19960614
Priority Number (s): GB19930026451 19931224; WO1994GB02813 19941223
IPC Classification: G01N33/543; G01N33/566; G01N33/53
EC Classification: G01N33/58, G01N33/58D
Equivalents: AU1321795, DE69411189D, DE69411189T, ☐ EP0736175 (WO9518376), B1, ES2120169T, JP9512899T

Abstract

PCT No. PCT/GB94/02813 Sec. 371 Date Jun. 14, 1996 Sec. 102(e) Date Jun. 14, 1996 PCT Filed Dec. 23, 1994 PCT Pub. No. WO95/18376 PCT Pub. Date Jul. 6, 1995A method for determining the concentration of an analyte 6 in a liquid sample is described. The method uses a binding agent 2 capable of binding the analyte 6 and first and second developing agents 8, 12, the first developing agent 8 capable of binding to unoccupied binding sites on the binding agent 2 and having a first marker 10, the second developing agent 12 capable of binding to the bound analyte or to the occupied binding sites and having a second marker 14 different from the first. The concentration of the analyte is determined by measuring the signals from the markers on first and second developing agents 8, 12. Thus, the method combines the competitive and non-competitive methods of the prior art and preferably has the advantage of extending the working range and/or sensitivity of the assay. A kit for performing the assay is also disclosed.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(11)特許出願公表番号

特表平9-512899

(43)公表日 平成9年(1997)12月22日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/543

識別記号
5 1 1

室内整理番号
 0276-2J

F I
G O I N 33/543

5 1 1 A

審查請求 未請求 予備審查請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願平7-517854
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)12月23日
(85) 翻訳文提出日	平成8年(1996)6月21日
(86) 国際出願番号	PCT/GB94/02813
(87) 国際公開番号	WO95/18376
(87) 国際公開日	平成7年(1995)7月6日
(31) 優先権主張番号	9326451.3
(32) 優先日	1993年12月24日
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)

(71)出願人 マルティライト リミティド
イギリス国, ロンドン ダブリュシー 1
ブイ 7ディーエー, ハイ ホルボーン
229-231 キングスボーン 하우스, セカ
ンド フロア, シー/オー ベンサム ア
ンド カンパニー

(72)発明者 エキンス, ロジャー フィリップ
イギリス国, サリー アールエイチ5 6
ジェイアール, コモン ドーキング, エー
ピンジャー, フライデイ ストリート, ポ
ンドウィード プレイス (番地なし)

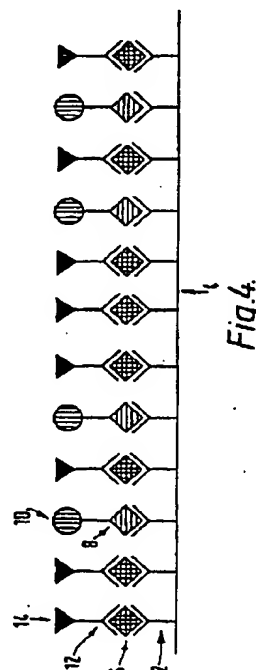
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

[最終頁に続く](#)

(54)【発明の名称】 結合アッセイ

(57) 【要約】

この発明は液体試料中の被分析物 6 の濃度の測定を、被分析物 6 と結合できる結合試薬 2 並びに、第 1 の現像試薬 8 は結合試薬 2 の占有されていない結合部位と結合でき、標識 10 を有するものであり、第 2 の現像試薬 12 は結合された被分析物または占有された結合部位と結合でき、第 1 の標識とは異なる、第 2 の標識 14 を有しているものである、第 1 および第 2 の現像試薬 8, 12 を用いて測定する方法およびキットに関する。被分析物の濃度は、第 1 および第 2 の現像試薬 8, 12 上の標識からのシグナルを測定することによって測定される。このようにしてこの方法は、従来の競合的方法および非競合的方法を結合して、好ましくはアッセイの実用範囲および／または感度を広げる。



【特許請求の範囲】

1. 液体試料中の被分析物の濃度を測定する方法であって、

(a) 液体試料を被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬と、結合部位の小部分が被分析物によって占有されるように接触させ、

(b) 第1および第2の現像試薬を用いて結合試薬を逆滴定し、ここで、第1の現像試薬は占有されていない結合部位に結合でき、第1の標識を有するものであり、第2の現像試薬は結合された被分析物または占有された結合部位に結合でき、第1の標識とは異なる第2の標識を有しているものであり、

(c) 第1および第2の標識によって生じたシグナルを測定して、被分析物によって占有された結合部位の部分の表わす数値を供級し、

(d) 該数値を既知の濃度の被分析物を含有する一連の標準溶液から得られる対応する数値と比較して、液体試料中の被分析物の濃度を得る：

ことを含んで成る方法。

2. 試料中の被分析物の周囲の濃度が著しく乱されないように少量の結合試薬を用いる請求項1に記載の方法。

3. 少量の結合試薬が 0.1 V/K モル以下であり、Vは液体試料の容積であって、Kは結合試薬に結合する被分析物についての会合常数である請求項2に記載の方法。

4. 各結合試薬が与えられた被分析物に対して特異的な結合部位を有している多数の結合試薬を用いて、液体試料中の多数の異なった被分析物の濃度を測定する上記請求項のいずれか1項に記載の方法。

5. 結合試薬が支持体上の別々の位置に固定化されている上記請求項のいずれか1項に記載の方法。

6. 多数の結合試薬のためのアッセイにおいて、多数の異なった結合試薬を、支持体上のそれらの位置によって別々に区別された異なった結合試薬を含有する別々の位置を滴定するのに、同じ第1および第2の現像試薬を用いる請求項5に記載の方法。

7. 特定の被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬が、その被分析物の

一連の濃度測定値が得られるように、支持体上の多数の別々の位置に固定化される上記の請求項のいずれか1項に記載の方法。

8. 別々の位置がマイクロスポットである請求項5から7のいずれか1項に記載の方法。

9. マイクロスポットの面積が 1 mm^2 より小さい請求項8に記載の方法。

10. 結合試薬が抗原に対する結合部位を有する抗体であるか、核酸被分析物に結合し得るオリゴヌクレオチドである上記請求項のいずれか1項に記載の方法。

11. 上記請求項のいずれか1項に記載の方法による液体試料中の被分析物の濃度を測定するためのキットであって、

(a) 被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬である結合試薬を付着させた固体支持体、

(b) 第1の現像試薬は占有されていない結合部位に結合でき、

第1の標識を有するものであり、第2の現像試薬は結合された被分析物または占有された結合部位に結合でき、第1の標識とは異なる第2の標識を有しているものである、第1および第2の現像試薬を含んでなる滴定試薬：を含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】**結合アッセイ****発明の分野**

この発明は結合アッセイ、たとえば液体試料における被分析物の濃度を測定することに関する。

発明の背景

液体試料中の被分析物、たとえば薬物やホルモンの濃度を、該液体と、被分析物に対し特異的な結合部位を有する結合試薬とを接触させ、該試薬に結合している被分析物を有する結合試薬を分離し、被分析物が占有している結合試薬の結合部位の割合を表わす数値（「小部分占有 (fractional occupancy)」という）を測定することによって測定することは既知である。一般的には、次に液体試料中の被分析物の濃度を、該小部分占有と既知の濃度の被分析物を含有している一連の標準溶液から得られた数値とを比較することによって決定することができる。

従来は小部分占有の測定は通常、いわゆる競合的方法または非競合的方法のいずれかを用いて、標識現像試薬を (developing reagent) 用いた逆滴定によって行われた。

競合的方法においては被分析物が結合した結合試薬は、一般的には被分析物の標識化変形体である標識現像試薬を用いて同時または連続的のいずれかで、逆滴定される。現像試薬は、濃度を測定される被分析物と、結合試薬の結合部位を獲得するために競合するということができる。標識された被分析物により占有された小部分の結合部位は、次いで上記のように被分析物の濃度に関連づけることができる。

非競合的方法においては、被分析物が結合した結合試薬を結合された被分析物または結合試薬上の占有された結合部位のいずれかと結合できる標識現像試薬を用いて逆滴定する。結合部位の小部分占有を、次いで標識現像試薬の存在を検出することによって測定し、競合アッセイと同様に、上記のように液体試料中で被分析物の濃度と関連づけることができる。

競合的方法および非競合的方法の両者において、現像試薬を検出できるように

標識を用いて現像試薬を標識化する。いろいろな標識、たとえば、放射性同位体、酵素、化学発光標識および蛍光標識が過去に用いられた。

免疫アッセイの分野においては、競合アッセイを一般にBersonおよびYalowによって、たとえば「調査および診断の内分泌学における方法 (Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology)」の第111～116ページに発表された設計則にしたがって実行する。競合免疫アッセイを行う際には、結合試薬を検出されるべき被分析物の約30から50%という低濃度と結合する量で用いる場合に、最高の感度が達成される。非競合免疫アッセイにおいては、最高の感度は通常、液体試料中の被分析物の100%近くまで結合するのに十分な結合試薬を用いることによって達成されることが考えられている。しかしながら、両方の場合において、これらの広く受け入れられた教示にそって設計された免疫アッセイにおいては、試料の容積を知る必要および用いられる結合試薬の量を正確に知るか、結合試薬の量が一定であることを知る必要がある。

国際特許出願第WO84/01031号において、私は液体試料中の被分析物の濃度を、被分析物に特異的な結合部位を有する少量の結合試薬と液体試料とを接触させることによって測定できることを開示し

た。この方法においては、結合試薬の量が液体試料中の被分析物の濃度に対し、ほんの少ししか影響しないほど少量であるなら、被分析物による結合試薬の結合部位の小部分占有は試料の容積と實際上無関係であることが分った。

このアプローチは、WO84/01031号のアッセイの感受性および容易さの開発を固体支持体の小さな区域（または「マイクロスポット」）上に位置する 0.1 V/K モル（Vは試料の容積で、Kは被分析物についての結合試薬の平衡常数である）よりも少ない量の結合試薬を用いることによって改良することを開示するEP304,202号をさらに改良するものである。

これらの両方の参考文献においては、被分析物による結合試薬の小部分占有を上述したように、競合的技術または非競合的技術のいずれかを用いて測定する。

より大なる感度を有するか、より広い実用範囲にわたってもまた、正確に被分析物の濃度を測定できる結合アッセイを開発することに継続するニーズがある。

発明の概要

この発明は、

(a) 液体試料を被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬と、結合部位の小部分が被分析物によって占有されるように接触させ、

(b) 第1および第2の現像試薬を用いて結合試薬を逆滴定し、ここで、第1の現像試薬は占有されていない結合部位に結合でき、第1の標識を有するものであり、第2の現像試薬は結合された被分析物または占有された結合部位に結合でき、第1の標識とは異なる第2の標識を有しているものであり、

(c) 第1および第2の標識によって生じたシグナルを測定して、被分析物によって占有された結合部位の部分を表わす数値を供給し、

(d) 該数値を既知の濃度の被分析物を含有する一連の標準溶液から得られる対応する数値と比較して、液体試料中の被分析物の濃度を得る：

ことを含んでなる液体試料中の被分析物の濃度を測定する方法を提供する。

したがって、この発明は従来技術の競合的または非競合的な方法を兼ね備えた被分析物の濃度を測定する方法を提供する。この発明は、むしろアッセイが所望の精確さの結果を提供できる実用範囲を広げるという利点を有している。これについては下記でさらに説明する。

都合のいいことには、第1および第2の標識は、放射性同位元素、酵素、化学発光標識または蛍光標識である。蛍光染料標識を用いることは、検出のために適切な色の範囲（励起および発光波長）の蛍光を供給するために蛍光染料を選択することができるので、特に好ましい。蛍光染料はクマリン、フルオレセイン、ローダミンおよびテキサスレッド (Texas Red) を含む。背景の蛍光が減衰した後、蛍光性シグナルの強度を測定するのに時間分解 (time-resolved) 蛍光を用いることを可能とするので、長期の蛍光時間を有する蛍光染料分子を用いることができる。蛍光標識または他の標識を含有するか、表面にそれらを担持するラテックス ミクロスフェア (microsphere) もこの発明の文脈に用い得る。標識からのシグナルをレーザー走査共焦点顕微鏡を用いて測定することができる。

一般的には、結合試薬は抗原に対して結合部位を有する抗体である。あるいは

結合試薬は標的核酸分子に、たとえば標的核酸分子に

相補的配列を持つことにより、結合することができるオリゴヌクレオチドであってもよい。

好ましくは、液体試料の容積を知る必要がないので、WO84/01031 号の「周囲の被分析物 (ambient analyte)」の技術に従って少量の結合試薬を用いる。上述したように、結合試薬の量は、液体試料中の被分析物の周囲濃度を著しく乱さないように十分に少量であるべきである。5%よりも少ない被分析物に結合する量の結合試薬を用いることが好ましい。しかしながら、もっと少量の、たとえば2%または1%の被分析物と結合する、結合試薬を用いることは、さらに被分析物の周囲濃度への妨害を減少させ、被分析物濃度の測定におけるエラーを最小限度にするのに役立つ。

さらに都合よく、 $0.1 V/K$ (EP304,204 号に記載したように、 V は試験帯に適用する試料の容積であり、 K は結合試薬に結合する被分析物の会合常数である) よりも大きくない濃度の結合試薬を用いると、この条件が被分析物の濃度にかかわらず満たされることを保証する。

この発明の一つの態様では、与えられた被分析物に特異的な結合部位をそれぞれ有する多数の異なった結合試薬を用いて、多数の異なった被分析物の濃度を同時に測定することができる。この場合好ましくは結合試薬は支持体上の別々の位置に、たとえばミクロスポットとして固定化される。

この態様では、多数の異なった試薬、すなわち、担体上のそれらの位置によって別々に区別される異なった結合試薬を含有する別々の位置を逆滴定するのに同じ第1の現像試薬および第2の現像試薬を用いることができる。したがって、検出するのに単に二つの種類の標識が必要であるという利点とともに共通の一对の現像試薬を用いることが可能である。

さらに、特定の被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬を、一連のその被分析物の濃度の繰り返しの測定を一度にできるように、支持体上の多数の位置に固定化することができる。

好ましくは、特に急速な測定が必要なときおよび／または試料の容積が 1 ml またはそれよりも小さいオーダーであるとき、位置は 1 mm^2 の面積を有するミクロスポットである。さらに結合試薬は好ましくは感度を最大にするようにミクロスポット内で高表面密度で存在すべきである。

この発明は上記の方法による液体試料中の被分析物の濃度を測定するためのキットも含んでおり、該キットは、

(a) 被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬である、結合試薬を付着させた固体基体、

(b) 第1の現像試薬および第2の現像試薬を含んでなる逆滴定試薬を含んでなり、ここで、第1の現像試薬は占有されていない結合部位に結合でき第1の標識を有するものであり、第2の現像試薬は結合された被分析物または占有された結合部位に結合でき、第1の標識とは異なる第2の標識を有するものである。

図面の簡単な説明

では、この発明をさらに添付図面を参照しながら例として記載する。

図1は、通常、アッセイの精度プロフィールと呼ばれる、アッセイにおけるその実用範囲へのエラーに関するグラフを示し、

図2は、従来技術の競合アッセイを示し、

図3は、従来技術の非競合アッセイを示し、

図4は、この発明によるアッセイの例を示し、

図5は、第1の現像試薬が結合部位の占有されていない結合試薬

と反応することによって発するシグナルおよび第2の現像試薬を占有されていない結合部位と反応することによって発するシグナルを観察することにより得られた応答曲線を示し、並びに、

図6は、競合および非競合のデータの別々の分析により得られた精度プロフィールと、データが割合 R_y 、すなわち、両現像試薬により発せられたシグナルの割合に依存して組み合わせられたときに得られたプロフィールとの比較を示す。

詳細な説明

図1はその実用範囲にわたってアッセイの精度がどのように変わるかを図解し

ている。この図はアッセイの精度プロフィール、すなわち、被分析物の濃度に対しプロットされた被分析物の濃度測定におけるエラー (CV) に関する曲線を表わす。アッセイの実用範囲は、その濃度範囲内では、アッセイの結果が受容できる精度 (一般的には10%より良い) である被分析物の濃度範囲 (XとYの間) を含む。アッセイの感度は、被分析物測定のCVが100 %を越えるよりは低い被分析物の濃度として表わされる。

しかしながら、アッセイの実用範囲および検出の下限を定義するために用いられるCV値は個々の選択の問題であり、そして、図1に描かれた一般的なコンセプトが広く容認されているにもかかわらず、この分野においては、これらの値に関して一般的に受け入れられた慣習はない。

高感度アッセイは、非常に低い被分析物濃度を高精度で、測定するために、すなわち、非常に低い検出限界をもたらすために暗黙のうちに設計されている。アッセイの効果的な感度は、一般に検出限界と密接に関係している値である、実用範囲の下限によっても表わされる。アッセイの感度を増加することは、検出の下限および実用

範囲 (X) の下限の両方を下げることを含む。しかしながら、アッセイの感度の増加は、また、実用範囲の上限 (Y) を下げると同時に発生する所望しない効果をもつことは、通常経験することである。言い換えると、高感度のために設計されたアッセイは一般に、高被分析物濃度の正確な測定には適さない。

図2から4では、結合試薬2を支持体4上に固定化した。結合試薬は被分析物6に特異的な結合部位を有している。結合試薬2と被分析物6を含有する液体試料とを接触させた後、被分析物6のいくらかは結合試薬2の結合部位に結合する。

図2において、標識10を担持する現像試薬8は被分析物6によって占有されていない結合試薬2の結合部位に結合する。現像試薬8による結合試薬2の結合部位の小部分占有を標識10を検出することによって測定する。これは液体試料中の被分析物6の濃度を、既知の濃度の被分析物6を含有する一連の標準溶液を用いて得られた結果と、標識10からのシグナルとを比較することによって確かめるこ

とを可能にする。

図3は結合試薬の結合部位に結合する被分析物6を標識14を担持する現像試薬12を用いて逆滴定することによって検出する非競合アッセイを示す。結合試薬2は被分析物6または結合試薬の占有された結合部位に結合し得る。被分析物による結合部位の小部分占有は次いで標識14を検出することによって測定する。図2に示されている競合アッセイの場合のように、標識14からのシグナルは、一連の既知の濃度の溶液を用いて得られた結果と照合することによって、液体試料中の被分析物6の濃度と関係づけることができる。

図4は、この発明に従って行われたアッセイを示す。結合試薬2を被分析物6と接触させた後に、結合部位の一部分は被分析物6によって占有される。次いで結合試薬2を第1および第2の標識10,

14を用いて標識された、第1および第2の現像試薬8, 12を用いて逆滴定する。標識10, 14はたとえば蛍光標識の場合には、異なった頻度および／または異なった蛍光減衰時をもった発色団を選択することによって区別できるシグナルを与えるように選択される。

この発明の方法は、従来の競合的アッセイまたは非競合的アッセイにまさるいくつかの重要な利点を有する。

第1に、二つの現像試薬を用いることは、提供された結合アッセイを用いることができる実用範囲を広げることを見い出した。これは低い被分析物濃度では、標識14を担持する非競合的現像試薬12の量および標識14の検出能が結合アッセイの実用範囲の下限のかぎとなる決定要因であるからである。言い換えると、非常に低い被分析物濃度は現像試薬12を用いて行われた標識14により生じたシグナルの測定によって卓越した精度で測定されるが、現像試薬8を用いて行われた標識10により生じたシグナルの重要性はより低い。

反対に、高い被分析物濃度では、標識10を担持する競合的現像試薬の量および標識10の検出能は結合アッセイの実用範囲の上限を決定するのに非常に重要である。言い換えると、高い被分析物濃度は現像試薬8を用いて行われた標識10によって生じたシグナルの観察により、卓越した精度で測定されるが、現像試薬12を

用いて標識14により生じたシグナルの重要性はより低い。

したがって、固体の支持体上の結合試薬に特異的に結合した両方の標識によって生じた特異的なシグナルを測定することにより、そして測定された特異的なシグナルに反する背景のシグナル（たとえば、固体の支持体上に非特異的に結合した現像試薬8および12によって生じた）を最小限にまで減らすことによって、実用範囲の下限を最低限まで小さくし、そして上限を最高限まで高くすることができ、それによってアッセイ系の実用範囲、すなわち、受容できる精

度で測定できる被分析物の濃度の範囲を拡張する。

他の利点は、それらが測定される異なった効率を考慮に入れて適切に調整した時、二つの標識によって発せられたシグナルの合計が、系に存在する結合試薬の総量の測定値を提供する時に生じる。従来技術においては、結合試薬の総量を知っていることまたはそれが一定であることが、しばしばアッセイの実行における必要条件である。以前には表面に均一の密度で、一定量の結合試薬（たとえば抗体）を固定化するのにかなりの困難性が見い出されたが、占有された部位と占有されない部位の測定値をもたらしことによって、この方法はこの問題を克服し、結合部位の総数を測定することを可能にする。

しかしながら、少量の結合試薬（たとえば試料中の5%よりも少ない被分析物と結合する）を用いてこの発明にしたがって行われるアッセイにおいて、二つの標識からのシグナルの比は被分析物濃度にのみ依存することが分かった。この観察の根拠は、このような状況の下では結合部位の小部分占有（ F_v ）は周囲の被分析物の濃度にのみ依存するという国際特許出願WO84/01031号に開示された発見である。

したがって、与えられた被分析物濃度 Y に対して、結合部位の総数を X とすると、 $F_v X$ 部位が占有され、 $(1 - F_v) X$ 部位が占有されていないものとなる。占有された部位により生じたシグナルの測定効率を ϵ_1 、占有されていない部位により生じたシグナルのそれを ϵ_2 とすると、占有された部位および占有されていない部位から生じたシグナルの比（ R_v ）は、 $\epsilon_1 F_v / \epsilon_2 (1 - F_v)$ または $C F_v / 1 - F_v$ （ここで $C = \epsilon_1 / \epsilon_2 = \text{一定}$ ）である。 F_v は周囲の被分析物濃度に

のみ依存し、Cは不知の試料および標準の両方に対し一定であるから、 R_y の測定はXの正確な値にかかわりな

く、Yの測定値をもたらす。

それにもかかわらず、比 R_v を応答変数として用いることは義務となっていないし、ある状況下、たとえばミクロスポットに位置する結合試薬の量の変化が低い時には、該量が本質的に一定であることを条件に含むことは、本当に不利であるかもしれない。このような状況では、競合アッセイおよび非競合アッセイのデータを別々に処理するのが好ましいだろう。この発明による競合アッセイおよび非競合アッセイの両方を組み合わせることの主要な利点はそれによってそこなわれない。

この発明の方法は、用いられた結合試薬の量が大い場合、たとえば液体試料中に存在する被分析物の総量の5%より多くが結合する場合にもより広い適応性がある。この場合には二つの標識からのシグナルの比は、被分析物濃度および結合試薬の量の両方に依存する。しかしながら、結合試薬の量は二つの標識からのシグナルの合計から測定できるので、二つのシグナルの比から試料中の被分析物濃度を得るために簡単な補正をすることができる。

したがって、この発明の方法は、固定化された結合試薬の量の変化は容易に補正できるので、一定量の結合試薬が異なった支持体上に固定化されたことを知る必要性をさけることもできる。

これらの状況においては、試料容積Vがわかっているか一定であるかのいずれかでなければならない。

占有された結合試薬の結合部位に向かう現像試薬に印をつけた標識によって発せられたシグナルを S_o で与え、

占有されていない結合試薬結合部位に向かう現像試薬に印をつけた標識により発せられたシグナルを S_u で与えよう。

そして、占有された部位および占有されていない部位へのそれぞれのシグナルに関係する定数をそれぞれ ϵ_o および ϵ_u と、

そして、 K = 被分析物と結合試薬の間の反応を支配する有効な平衡定数としよう。

そこで、試料中の被分析物濃度を Y で与えると、

$$Y = (S_0 / \epsilon_0) [\epsilon_u / (KS_u) + 1 / V]$$

V が既知と仮定すると、この式は二つの未知の常数 ϵ_0 および ϵ_u / K を含んでいる。シグナル S_0 および S_u を一連の既知の被分析物濃度について測定することによって、これらの常数を決定でき、そして、未知である被分析物濃度を S_0 および S_u の相当する測定から推定することができる。

周囲の被分析物の状態の下では、項 $1 / V$ は無視でき、 S_0 / S_u は周囲の被分析物濃度に比例する。

例

試薬：

1. 蛍光親水性ラテックス ミクロスフェア、直径 $0.227 \mu m$ (Ex642 nm、Em653 nm)、Boehringer Mannheim から入手。

2. フッ化球体硫酸塩 (Sulfate Fluo Spheres) 直径 $0.1 \mu m$ (Ex490 nm、Em515 nm)、Molecular Probesから入手。

3. グリシン、トウイーン (Tween) 20、MES (2- [N-モルホリノ] エタンサルホン酸)、無水オルトリン酸水素ジナトリウム、オルトリン酸ジ水素ナトリウム、エチルー 3 (3-ジメチルアミノ) プロピルカルボジイミド塩酸塩、RIA 級ウシ血清アルブミン、トリツマ (Trizma) およびナトリウムアジド、Sigma から入手。

4. 甲状腺刺激ホルモン (TSH)、NIH USA から入手。

5. 抗-TSH モノクローナル捕獲および現像抗体、Boehringer Mannheim から入手。

蛍光親水性ラテックス ミクロスフェアへの抗-TSH マウスのモノクローナル抗体の複合

1. 2回蒸留した水 $0.5 ml$ の中の $10mg$ の蛍光親水性ラテックスミクロスフェアに $0.5 ml$ の 1% トウイーン 20 を添加し、室温で 15 分間振とうし、TSE High SPin2

0 遠心分離機中で20,000rpmで8℃で10分間遠心分離した。

2. ペレットを2 mlの0.05M MES (2-[N-モルホリノ] エタンスルホン酸) 緩衝液pH6.1 中に分散させ、遠心分離した。

3. 工程2を繰り返した。

4. ペレットを0.8 mlのMES 緩衝液に分散させた。

5. 100 μ l の2 mgの抗-TSH モノクローナル現像抗体をミクロスフェアに加え、室温で15分間振とうした。

6. 該混合物に100 μ l の0.25%エチルー3 (3-ジメチルアミノ) プロピルカルボジイミド塩酸塩を加え、室温で2時間振とうした。

7. 該混合物に100 μ l のMES 緩衝液中の10mgのグリシンを加え、さらに30分間振とうし、遠心分離した。

8. ペレットを2 mlの1%BSA 中に分散させ、室温で1時間振とうし、遠心分離した。

9. ペレットを2 mlの1%BSA に分散させ、室温で1時間振とうし、遠心分離した。

10. ペレットを2 mlの0.1Mリン酸塩緩衝液pH7.4 中に分散させ、遠心分離した。

11. 工程10を2回繰り返した。

12. ペレットを2 mlの0.1%のナトリウムアジドを含有する1%BSA 中に分散させ、4℃で貯蔵した。

黄色/緑色フッ化球体硫酸塩へのTSH の吸着

1. 50 μ l の50mgのTSH を350 μ l の0.1Mリン酸塩緩衝液、pH7.4中の4 mgのフッ化球体硫酸塩に加え、室温で1晩振とうした。

2. 該調製物を、MSE High-Spin20 遠心分離機中で、8℃で15分間、20,000rpmで遠心分離した。

3. ペレットを2 mlの1%BSA に分散させ、1時間振とうし、遠心分離した。

4. ペレットを2 mlの0.5%トウイーン20中に分散させ、30分間振とうさせ、遠心分離した。

5. ペレットを2 mlのリン酸塩緩衝液に分散させ、遠心分離した。
6. 工程4を2回繰返した。
7. ペレットを0.1 %ナトリウムアミドを含有する1 % BSA 中に分散させ、4℃で貯蔵した。

組み合わせられた競合または非競合マイクロスポット サンドイッチTSH アッセイ

1. 各黒のDynatech Micro Fluorマイクロ滴定ウエル上に0.1Mリン酸塩緩衝液pH 7.4 中、濃度200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で抗体の一滴が0.5 μl の滴を置くことによって、捕獲抗-TSH 抗体マイクロスポットを作った。滴を直ちに吸引した。

2. ウエルを1 %のBSA であふれさせ、1時間振とうし、リン酸塩緩衝液で洗浄した。

3. 二重のウエルに200 μl のTSH 標準液 (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 75, 150 および300 $\mu\text{U}/\text{ml}$)を加え、これらを2時間振とうし、0.05%トウイーン20を含有するリン酸塩緩衝液で洗浄した。

4. 占有された抗体結合部位を測定するために50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗-TSH 現像抗体が複合した親水性マイクロスフェアの200 μl を全ウエルに加え、これらを1時間振とうし、リン酸塩-トウイーン20緩衝液で洗浄した。

5. 占有されていない抗体結合部位を測定するために50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のTSH -複合マイクロスフェア硫酸塩の200 μl を全ウエルに加え、これらを1時間振とうし、リン酸塩-トウイーン20緩衝液で洗浄し、レーザー走査共焦点顕微鏡で走査した。

図5は第2の現像試薬(標準化抗体)と占有された「センサー」抗体結合部位とを反応させ、第1の現像試薬(標準化TSH)を占有されてない結合部位と反応させることによって発せられたシグナルを観察することによって得られた応答曲線を描く。第1および第2の標識からのシグナルは組み合わせあって、被分析物濃度に対してプロットされた、比 R_v を与える。したがって、図5は、被分析物濃度に対する R_v の変化は被分析物濃度の広い範囲にわたって滑らか、すなわち、アッセイの実用範囲は従来技術の競合的方法または非競合的方法よりも大きいことを示す。

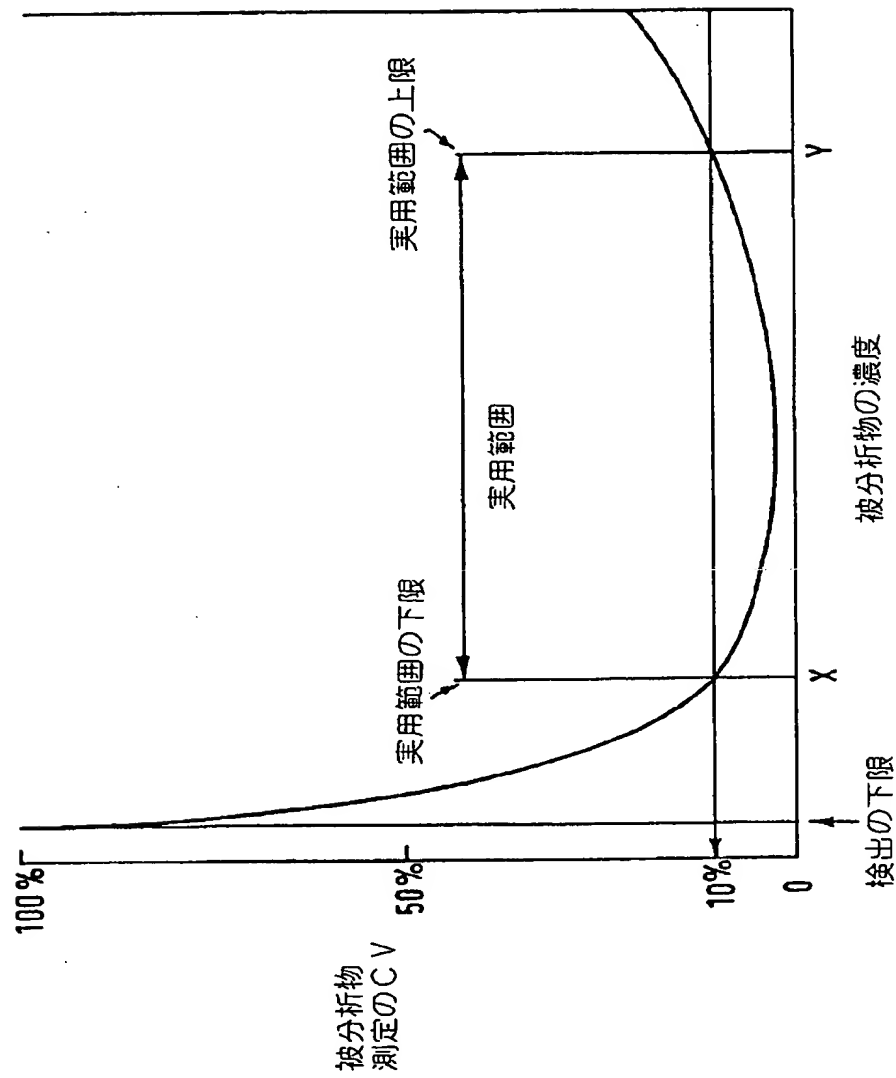
図6は、競合的および非競合的データの別々の統計上の分析によって得られた精度プロフィールと上述したように、データが応答変数としての比 R_v を信頼して組み合わされたときに得られたプロフィールの比較を示す。

非競合アッセイ（AからC）および競合アッセイ（DからE）の両方の実用範囲は、Bから $1000\mu\text{U}/\text{ml}$ より上まで広がる組み合わされたアッセイの実用範囲よりも制限されていることに注意せよ。

このグラフも、ある状況下では、比 R_v に頼ることを不利にする現象も説明している。しかしながら、これらの状況においてデータを異なった方法で処理することが可能である。この現象（該比を信頼して該範囲のある部分にわたって得られた精度は、別々にデータを処理することにより得られたものと比較して低い）は、比における統計上のエラーは、特に、マイクロスポットにおける結合試薬の量が一定であれば、個々の測定の一つにおけるそれよりも大きいとい

う事実から生じる。この状況下では、低被分析物濃度の試料は非競合的データを信頼して、高被分析物濃度のものは競合的データを信頼して測定することができる。

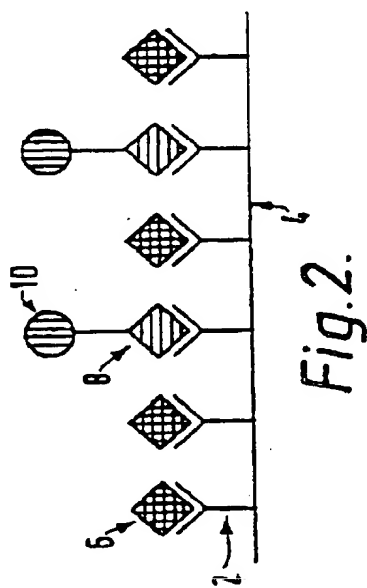
【図1】



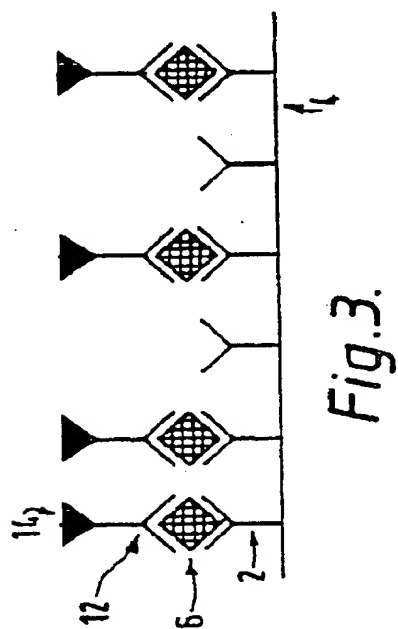
被分析物の濃度

Fig.1.

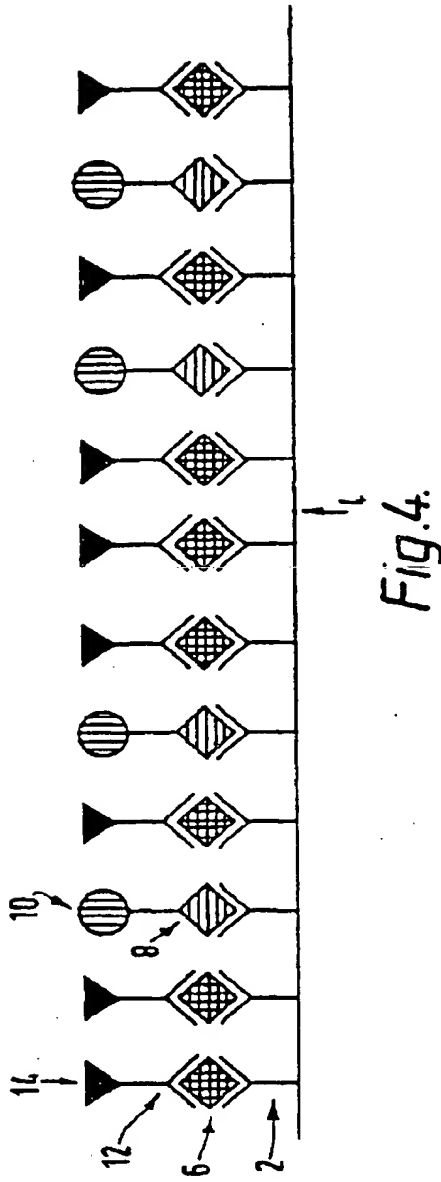
【图 2】



【图 3】



【图4】



【図5】

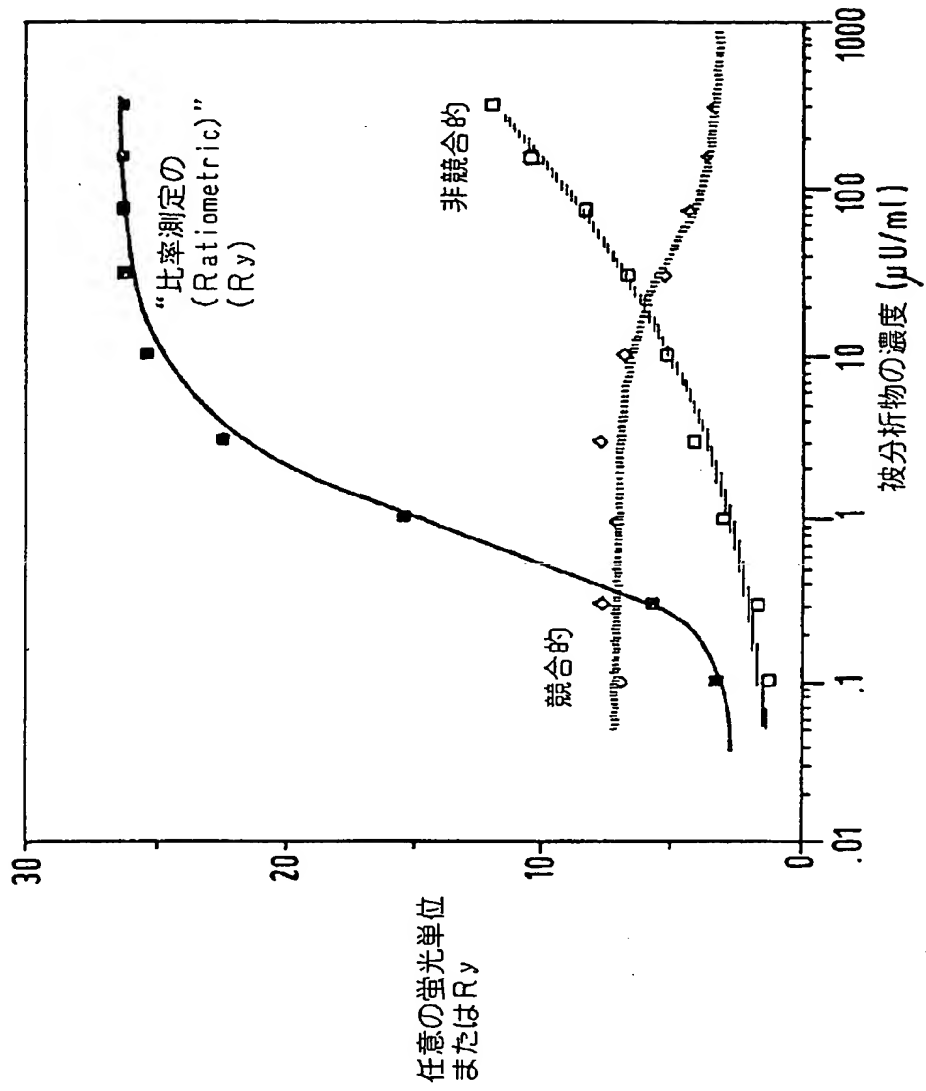


Fig.5.

【図6】

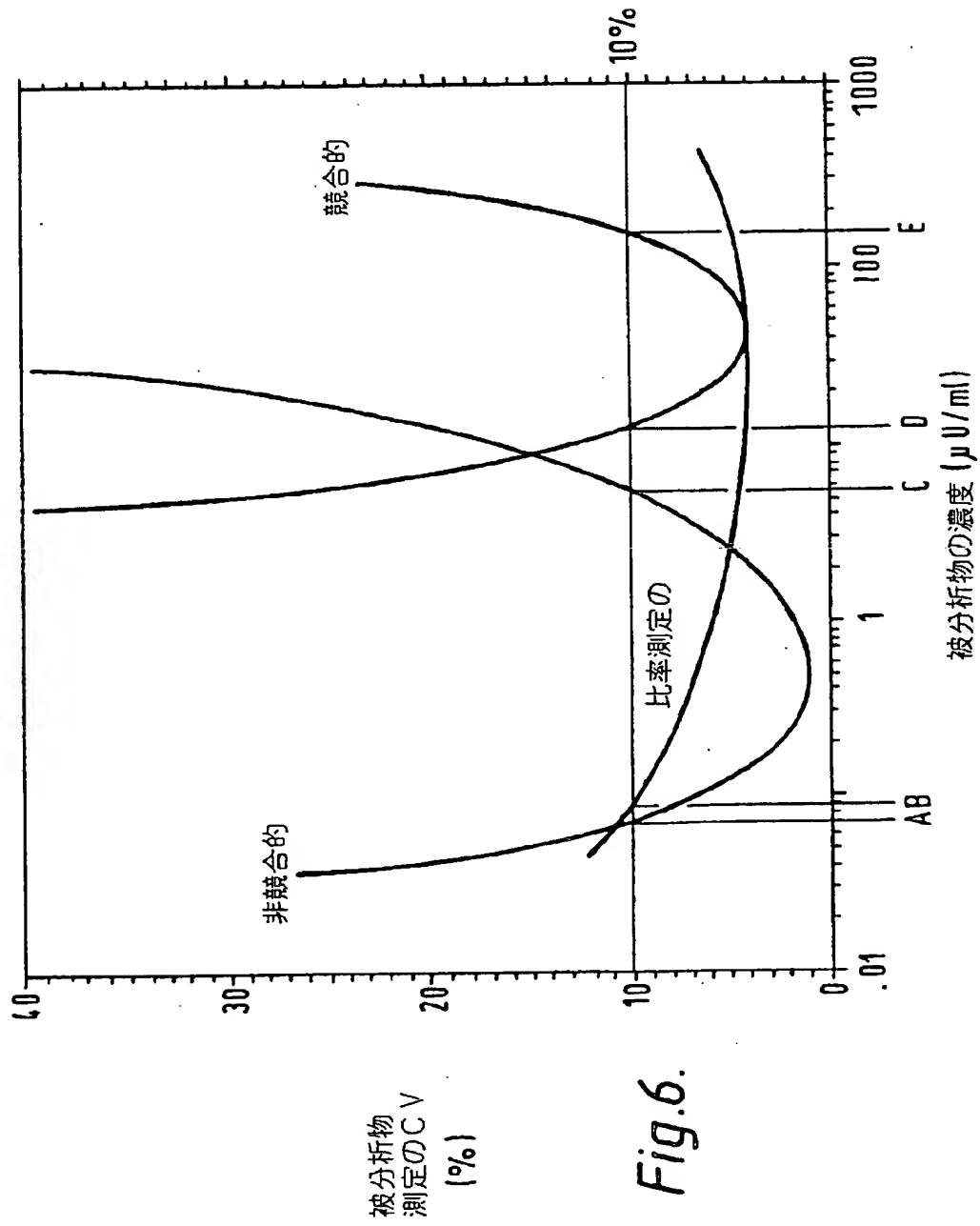


Fig.6.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/GB 94/02813		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/543 G01N33/58		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,88 01058 (R. PH. EKINS) 11 February 1988 see the whole document	1-11
Y	WO,A,88 09503 (THE MCLEAN HOSPITAL CO.) 1 December 1988 see the whole document	1-11
A	WO,A,84 01031 (R. PH. EKINS) 15 March 1984 cited in the application	
A	EP,A,0 304 202 (R. PH. EKINS) 22 February 1989 cited in the application	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 1995		Date of mailing of the international search report 10. 05. 95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cartagena y Abella,P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB 94/02813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8801058	11-02-88	AU-B- 614935	19-09-91
		AU-A- 7755987	24-02-88
		FI-C- 92881	10-01-95
		FI-B- 92881	30-09-94
		JP-T- 1503405	16-11-89
		US-A- 5171695	15-12-92
		CA-A- 1284620	04-06-91
		DE-A- 3784465	08-04-93
		EP-A, B 0271974	22-06-88
		EP-A- 0318491	07-06-89
WO-A-8809503	01-12-88	US-A- 5098846	24-03-92
		EP-A- 0359780	28-03-90
WO-A-8401031	15-03-84	AU-A- 1944283	29-03-84
		EP-A, B 0134215	20-03-85
		JP-B- 6064059	22-08-94
		JP-T- 59501480	16-08-84
EP-A-0304202	22-02-89	AU-A- 2253488	01-03-89
		DE-A- 3872621	13-08-92
		EP-A- 0375700	04-07-90
		FI-B- 92110	15-06-94
		WO-A- 8901157	09-02-89
		CA-A- 1334278	07-02-95
		JP-T- 3503081	11-07-91

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM,
AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C
N, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE
, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK,
LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, N
L, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE
, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成13年6月12日(2001.6.12)

【公表番号】特表平9-512899

【公表日】平成9年12月22日(1997.12.22)

【年通号数】

【出願番号】特願平7-517854

【国際特許分類第7版】

G01N 33/543 511

【F1】

G01N 33/543 511 A

平 願 補 正 書

平成13年1月//日

特許庁長官 及 川 雅 道 殿

1. 事件の表示

平成7年特許願第517854号

2. 補正をする者

名称 マルティライト リミティド

3. 代理人

住所 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル
〒和特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁護士(7751)石 田 敬

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

請求の範囲を下記の通り補正する。

7. 添付書類の目録

請求の範囲

1通

請求の範囲

1. 液体試料中の被分析物の濃度を測定する方法であって、

(a) 液体試料を被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬と、結合部位の小部分が被分析物によって占有されるように接触させ、

(b) 第1および第2の検出装置を用いて結合試薬を逆滴定し、ここで、第1の検出装置は占有されていない結合部位に結合でき、第1の標識を有するものであり、第2の検出装置は結合された被分析物または占有された結合部位に結合でき、第1の標識とは異なる第2の標識を有しているものであり、

(c) 第1および第2の標識によって生じたシグナルを測定して、被分析物によって占有された結合部位の部分の表わす数値を供給し、

(d) 該数値を既知の濃度の被分析物を含む一連の標準溶液から得られる対応する数値と比較して、液体試料中の被分析物の濃度を得ることを含んで成る方法、

2. 試料中の被分析物の濃度の測定が著しく乱されないように少量の結合試薬を用いる請求項1に記載の方法、

3. 少量の結合試薬が0.1 V/K未満であり、Vは液体試料の容積であって、Kは結合試薬に結合する被分析物についての結合定数である請求項2に記載の方法、

4. 各結合試薬が与えられた被分析物に対して特異的な結合部位を有している多数の結合試薬を用いて、液体試料中の多数の異なる被分析物の濃度を測定する上記請求項のいずれか1項に記載の方法、

5. 結合試薬が支持体上の別々の位置に固定化されている上記請求項のいずれか1項に記載の方法、

6. 多数の結合試薬のためのアッセイにおいて、多数の異なる結合試薬を、支持体上のそれらの位置によって別々に区別された異なる結合試薬を含む別々の位置を測定するのに、同じ第1および第2の検出装置を用いる請求項5に記載の方法、

7. 特定の被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬が、その被分析物の一連の濃度測定値が与えられるように、支持体上の多数の別々の位置に固定化され

る上記の請求項のいずれか1項に記載の方法。

8. 別々の位置がミクロスポットである請求項5から7のいずれか1項に記載の方法。

9. ミクロスポットの面積が $1\mu^2$ より小さい請求項8に記載の方法。

10. 結合試薬が抗原に対する結合部位を有する抗体であるか、抗原被分析物に結合し得るオリゴヌクレオチドである上記請求項のいずれか1項に記載の方法。

11. 上記請求項のいずれか1項に記載の方法による被検試料中の被分析物の濃度を測定するためのキットであって、

(a) 被分析物に特異的な結合部位を有する結合試薬である結合試薬を含むさせた固相支持体、

(b) 第1の現像試薬は占有されていない結合部位に結合でき、

第1の標識を有するものであり、第2の現像試薬は結合された被分析物または占有された結合部位に結合でき、第1の標識とは異なる第2の標識を有しているものである、第1および第2の現像試薬を含んでなる測定試薬；
を含んでなるキット。